

THÈSE

présentée

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lyon

pour obtenir

le diplôme de Docteur de Spécialité (3^e Cycle)

de Sciences Biologiques (Biologie Appliquée)

par

Claude-Andrée SENDER

**INCORPORATION DE LA THYMIDINE TRITIÉE
DANS LES CELLULES GERMINALES
DE CAENORHABDITIS BRIGGSÆ (NÉMATODES : RHABDITIDÉS)**

Soutenue le . octobre 1965
devant la commission d'examen :

MM. NIGON

Président

LEGAY

LAVIOLETTE

} Examineurs

Travaux du Laboratoire de Zoologie Expérimentale
de la Faculté des Sciences de Lyon — N° 12

C l a u d e S E N D E R

L'INCORPORATION DE LA THYMIDINE TRITIÉE DANS LES CELLULES GERMINALES DE
CAENORHABDITIS BRIGGSÆ (NEMATODES RHABDITIDES)



Travaux du Laboratoire
de Zoologie Expérimentale



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553406_0029

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE DES SCIENCES

Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD, EYRAUD Henri, DEJARDIN, VIRET.

Doyen

M. BRACONNIER

Assesseurs

MM. MESNARD
BOIDIN

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
PRETTRE	Chimie industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
AUMERAS	Chimie générale II
COLONGE	Chimie organique
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD	Physique industrielle
DUFAY Jean	Astronomie
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER Henri	Géologie générale
WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
CUEILLERON	Chimie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée
SARAZIN	Physique nucléaire
BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
PERES	Physiologie

MM. MESNARD	Electronique
GRANDMONTAGNE	Physique
BOUTILLIER	Minéralogie
LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
DREUX	Chimie organique
TEICHNER	Chimie industrielle
PAVANS de CECCATTY	Zoologie
MERLIN	Chimie analytique
DUFAY Maurice	Physique de l'Atmosphère
PHILBERT	Physique nucléaire
COHEN-ADAD	Chimie
DAVID Louis	Géologie générale
CHANEL	Psychophysiologie
MAURY	Méthodes Mathématiques de la Physique
DEPRAZ	Physique nucléaire
GAUTHIER Jean	Chimie
GAUME	Physique expérimentale

Professeurs sans chaire

MM. FERON	Mathématiques
LAFORGUE	Physique
LEGAY	Zoologie expérimentale S.P.C.N.
UZAN	Physique S.P.C.N.
CHENEVOY	Géologie appliquée
GINET	Zoologie
ASCH	Physique
MICHEL Pierre	Minéralogie
DUCET	Biologie végétale
Mle MAITROT	Physique
GEVIN	Géologie générale
PONASSE	Mathématiques
d'INCAN	Physique
LEFEBVRE	Mathématiques
PERNET	Mathématiques
CHERY	Physique
BERGEON	Physique C.S.U.
Mle GAUTHERON	Chimie biologique
DESCOTES	Chimie, organique
ERBEIA	Physique
Mme ERICSON	Physique générale
LEMOIGNE	Botanique

Maîtres de Conférences

MM. MARTEL	Mécanique
MATHIEU	Mécanique des Fluides
PICARD Philippe	Mathématiques
DEMARCO	Géologie générale

MM. MICHEL Georges
LEBRETON
DAVID Jean
TOUSSET
FEUVRAIS
PICARD Claude
SCHMITT
LAURENT
ROT
BETHOUX
Mle CALAIS
GUSAKOW
Mle THOMAS

Biochimie
Biologie végétale
Biologie animale
Chimie propédeutique
Physique Electricité
Mathématiques
Physique M.P.C.
Chimie organique
Mathématiques
Mathématiques T.M.P.
Mathématiques C.S.U.
Physique
Chimie Minérale

Maître de Conférences adjoint

M. PIERRON

Chimie

Conseiller administratif

M. BURNET

Secrétaire Principal Honoraire

M. ROUX

On ne commande à la Nature
qu'en lui obéissant

BACON

En présentant cette thèse, je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Professeur NIGON qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et m'a permis d'effectuer ce travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur LEGAY et Monsieur le Professeur LAVIOLETTE qui m'ont fait l'honneur de faire partie du Jury de ma thèse.

A Madame GODET, j'adresse mes très sincères remerciements ; ses encouragements et ses conseils m'ont toujours été précieux.

Je n'oublierai pas Madame SZAFRANEK et Madame GUERRIER qui ont assuré l'impression et l'illustration de ce texte avec une rare compétence ; qu'elles trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

S O M M A I R E

	Pages
INTRODUCTION	
CHAPITRE I - MATERIEL ET TECHNIQUES	3
A - Matériel biologique	3
B - Techniques d'élevage	6
C - Techniques histochimiques	11
CHAPITRE II - INCORPORATION DE LA THYMIDINE TRITIEE	14
A - Incubations en milieu d'élevage	14
B - Incubations dans d'autres milieux	20
C - Discussion	23
CHAPITRE III - EVOLUTION DU MARQUAGE PENDANT LES POST- INCUBATIONS EN MILIEU NON TRITIE	30
A - Postincubations en milieu d'élevage	30
B - Postincubations en solution de phosphates	33
C - Discussion et interprétation	33
CONCLUSION GENERALE	38
BIBLIOGRAPHIE	40

I N T R O D U C T I O N

L'acide désoxyribonucléique (= ADN) est présent dans les noyaux des cellules en quantité spécifique du type cellulaire considéré. On admet que cette quantité est directement proportionnelle au nombre des chromosomes, et par conséquent reste constante entre deux cycles de division. On considère aussi, de façon courante, que sa structure est inaltérée pendant toute la vie de la cellule. A ces titres, l'ADN est apparu, depuis sa découverte, comme le support moléculaire de l'hérédité. Il préside, dans chaque cellule nouvellement formée, à la synthèse des produits cellulaires spécifiques.

La synthèse d'ADN conduit soit à une division cellulaire qui ramène la quantité d'ADN à sa valeur initiale, soit à une endomitose qui augmente la quantité totale d'ADN et fait apparaître des cellules polyploïdes. Elle se traduit par l'incorporation de précurseurs radioactifs plus ou moins spécifiques.

Depuis quelques années, l'inertie métabolique de l'ADN a été remise en question. Plusieurs auteurs signalent que des cellules, appartenant à certains organes de Mammifères, peuvent incorporer un précurseur marqué de l'ADN sans qu'aucune division ni polyploïdie s'ensuive. C'est le cas par exemple des cellules de vésicule séminale (PELC, 1962, 1963, 1964) des cellules du foie (DEVIK et HALVORSEN, 1963) et des cellules amniotiques (CHANG et VETROVS, 1963). De plus, lorsque ces cellules, maintenues en culture, sont transférées d'un milieu radioactif dans un milieu froid, elles présentent un affaiblissement notable de leur marquage. Ces expériences ont fait

naître l'idée de l'existence d'un ADN "métabolique" qui, à l'exemple d'autres produits cellulaires (ARN, Protéines, etc...), se renouvellerait. D'après PELC (1964) le renouvellement résulterait de l'incapacité de l'ADN d'assumer au bout d'un certain temps toutes les fonctions qui lui incombent. Le mécanisme par lequel s'effectuerait le renouvellement de l'ADN nous échappe encore totalement. Son existence n'est même pas admise par tous les auteurs.

NONNENMACHER-GODET et DOUGHERTY (1964) semblaient avoir trouvé, avec le Nématode Caenorhabditis briggsae, un matériel de choix pour étudier l'activité métabolique de l'ADN. D'après ces auteurs, en effet, les cellules intestinales et germinales de C. briggsae seraient le siège d'un renouvellement d'ADN qui se manifesterait par l'incorporation massive de la thymidine tritiée et par la disparition d'une grande partie de la radioactivité lors du transfert en milieu non radioactif.

Dans le but d'étudier les rapports entre l'activité métabolique de l'ADN et la physiologie de C. briggsae, naturellement liée à la qualité du milieu d'élevage, nous avons repris les expériences de NONNENMACHER-GODET et DOUGHERTY. Ces expériences concernent des animaux élevés en culture axénique. Elles consistent à suivre, par la technique autoradiographique, d'abord l'incorporation de la thymidine H_3 - précurseur spécifique de l'ADN - ensuite la stabilité du marquage pendant une postincubation en milieu non radioactif.

Nos premiers résultats n'ayant pas exactement concordé avec ceux de NONNENMACHER-GODET et DOUGHERTY, nous avons été amenés à faire varier divers facteurs liés au milieu d'incubation (composition chimique, concentration molaire, pH), aux animaux (âge, mode d'élevage) et aux modalités expérimentales (durée de l'incubation, quantité de thymidine tritiée). Nous verrons l'ensemble des résultats fournis par les incubations tritiées et les post-incubations en milieu non tritié, avant d'envisager comment ces résultats apportent des données nouvelles concernant la physiologie de l'appareil génital de C. briggsae.

CHAPITRE I

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Le Nématode sur lequel a porté notre travail, Cænorhabditis briggsae, a été isolé du sol en 1944 par M. BRIGGS GOCHNAUER aux Etats-Unis. Il n'a pas cessé, depuis, d'être cultivé sur divers milieux nutritifs par DOUGHERTY et ses collaborateurs. Nous décrirons cet animal avant d'exposer les techniques d'élevage et les techniques histochimiques.

A - MATÉRIEL BIOLOGIQUE

C. briggsae diffère très peu d'une autre espèce, C. elegans, qui a fait l'objet de nombreuses études cytologiques et génétiques dans notre laboratoire (NIGON, 1949 - NIGON et BRUN, 1955 - BRUN, sous presse). Ces deux espèces de Rhabditidés sont le plus souvent des hermaphrodites protandres et autogames, les individus mâles n'apparaissant que dans certaines conditions de culture.

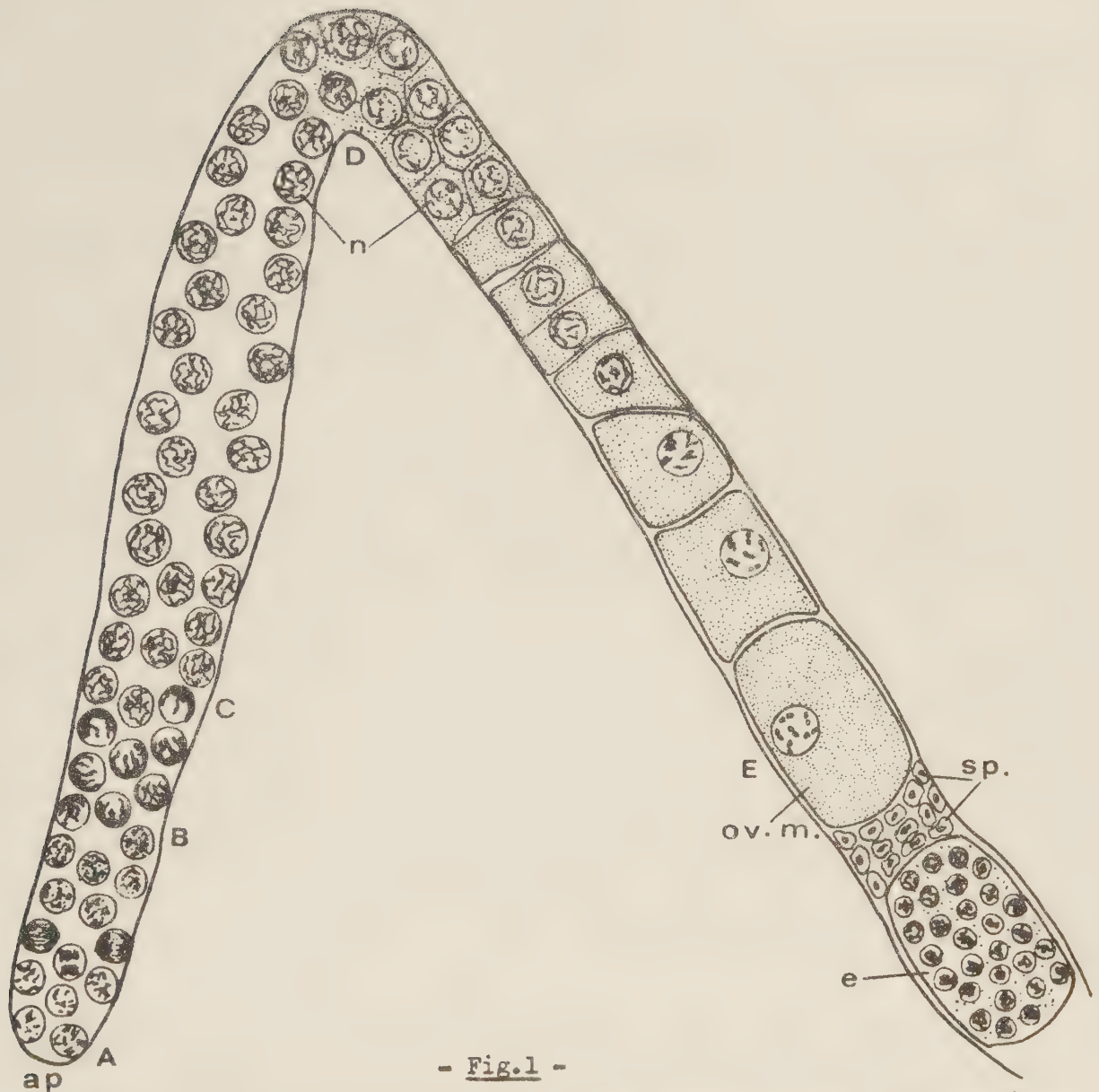
Les animaux adultes mesurent environ un millimètre de longueur sur 0,1 millimètre de diamètre. Leur corps cylindrique est recouvert d'une mince cuticule et contient l'appareil digestif et les deux glandes génitales. L'appareil digestif est constitué de l'oesophage, élargi en bulbe, et de l'intestin, dont la paroi est formée d'un nombre constant de cellules volumineuses à gros noyaux. Les glandes génitales ont chacune la forme d'un tube coudé en son milieu ; les deux tubes génitaux, fermés à leur extrémité pro-

ximale, ou apex, se réunissent avant de déboucher par un orifice commun.

Dans la région apicale ou germigène, des cellules de petite taille ou gonies se multiplient alors que, dans le reste du tube, elles se différencient en gamètes.

Les premiers gamètes formés deviennent des spermatozoïdes ; ils s'accumulent dans la région terminale de chaque tube qui fait fonction de réceptacle séminal. Lorsque la spermatogenèse est terminée, les gamètes deviennent tous des ovocytes.

La différenciation des gonies en gamètes s'accompagne des transformations nucléaires liées à la méiose. Ces phénomènes cytologiques ont été étudiés en détail par NIGON et BRUN (1955) dans le cas de l'ovogenèse de C.elegans. Ces auteurs ont observé qu'après la zone de multiplication de la région apicale, plusieurs cellules reproductrices voisines évoluent en même temps et se trouvent, à un moment donné, au même stade nucléaire. Ils ont ainsi pu définir, à l'intérieur de chaque glande génitale, une suite de zones correspondant aux différents stades nucléaires. Après la zone de multiplication ou germigène (figure 1 - AB) la prophase méiotique débute par le stade synapsis caractérisé par une structure chromatinienne très condensée (figure 1 - BC). Elle se poursuit par le stade pachytène (figure 1 - CD) où les chromosomes, très allongés, sont enroulés autour du nucléole et présentent des anses typiques. Elle se termine par le stade de la diacinèse (figure 1 - E) avec la formation des six bivalents caractéristiques des ovocytes mûrs. Dès le début du pachytène, tandis que les structures nucléaires des ovocytes évoluent, leur cytoplasme s'accroît par accumulation de réserves : la longueur des cellules passe en effet de 5 μ pour les ovogonies à 150 μ pour les ovocytes mûrs. Au stade final de leur évolution, ces derniers arrivent au niveau des spermatozoïdes et sont fécondés. La fécondation provoque l'émission des globules polaires et les premières divisions de l'oeuf se déroulent dans le tube génital avant la ponte. Les premiers oeufs pondus traduisent la maturité sexuelle femelle des individus ; elle a lieu plus ou moins tôt suivant les conditions d'élevage. Les oeufs donnent naissance en moins de vingt-quatre heures à de petites larves qui subissent quatre mues avant d'atteindre la taille adulte.



- Fig.1 -

Structure d'une gonade et distribution des divers stades de l'ovogenèse.

A - B : germigène

B - C : synapsis

C - D : pachytène

D E : évolution diacinétique et vitellogenèse.

ap : apex

ov.m. : ovocyte mûr à 6 bivalents

e : embryon

sp.: spermatozoïdes.

n : noyaux

B - TECHNIQUES D'ELEVAGE

L'élevage de C. briggsae au laboratoire peut se faire suivant trois modalités : xénique, monoxénique et axénique.

Les cultures xéniques sont obtenues en prélevant directement les Nématodes dans leur milieu naturel, le sol, et en les repiquant sur un milieu gélosé contenant des peptones et des sels minéraux (BRIGGS, 1946, NIGON, 1949). Ils se nourrissent des nombreux microorganismes qui se développent dans la culture.

Dans les cultures monoxéniques, au contraire, les Nématodes sont élevés sur gélose nutritive dans des tubes de monoculture bactérienne, le plus souvent Escherichia coli (DOUGHERTY, 1953). Ces deux types d'élevage sont réalisés à une température comprise entre 13° C et 20° C.

Les cultures axéniques sont caractérisées par l'absence de tout organisme autre que C. briggsae. Elles présentent l'avantage d'éviter l'interférence entre le métabolisme des Nématodes et celui d'autres individus.

C'est cette dernière modalité d'élevage que nous avons adoptée et que nous décrirons. Nous parlerons d'abord de l'axénisation des Nématodes, puis de la fabrication du milieu d'élevage et des méthodes de repiquages.

1) L'axénisation

Notre élevage a débuté à partir d'une culture monoxénique sur gélose nutritive qui nous a été aimablement envoyée des Etats-Unis par Mr DOUGHERTY.

L'axénisation, c'est-à-dire l'élimination des E. coli de la culture, doit être faite en conditions parfaitement stériles. Nous avons suivi la méthode utilisée par FATT (1961). La verrerie, préalablement stérilisée, comprend une boîte de Petri contenant 8 petites salières, et des micropipettes effilées pour le transfert des Nématodes. La technique consiste à prélever des animaux adultes monoxéniques, à les rincer plusieurs fois dans une solution stérile de phosphates tamponnée, M/15, pH 7 (figure 2, salières 1, 2, 3). Ensuite, les adultes sont laissés pendant 1 heure dans un bain d'une solution d'antibiotiques (1000 u/ml de pénicilline + 100 γ/ml de streptomy-

cine, salière 4). Puis ils sont passés dans trois nouveaux bains (salières 5, 6, 7) de la solution de phosphates. Le rinçage terminé, on sélectionne les jeunes adultes qui sont laissés 24 heures dans un quatrième bain (salière 8); les larves nées pendant ce temps sont repiquées dans des tubes contenant le milieu d'élevage pour culture axénique.

Pour s'assurer de la réussite de l'axénisation, il faut soumettre la solution de phosphates du dernier rinçage et le milieu de culture des premiers Nématodes obtenus à des contrôles de stérilité. Dans ce but, une certaine quantité de ces deux liquides est ajoutée à des tubes contenant soit du bouillon de coeur Difco, soit de la gélose nutritive Difco à 1,5%. Ces tubes sont placés dans une étuve à 37° C et observés après 48 heures pour déceler la trace éventuelle d'un développement bactérien. Par mesure de sécurité, le séjour des tubes à 37° C est prolongé pendant huit jours.

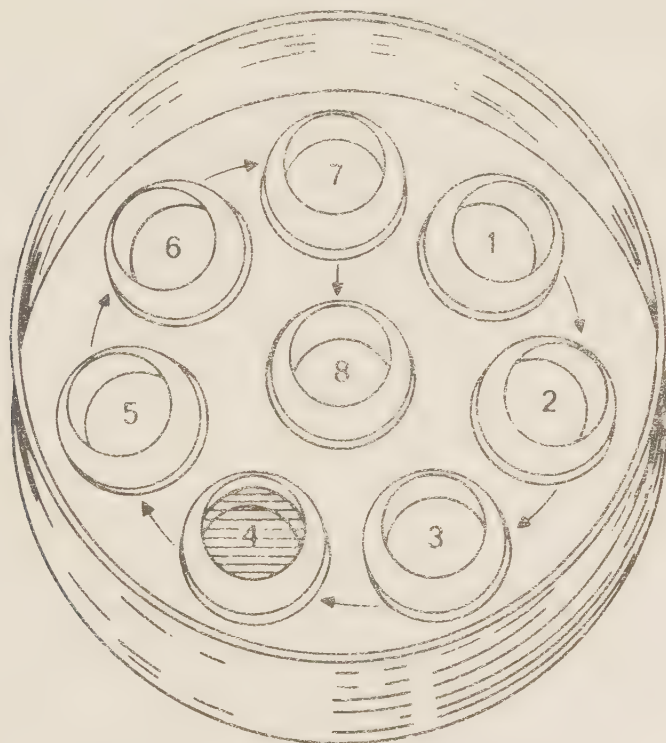


Fig.2 .- Schématisation du procédé d'axénisation d'après FATT.

Dans la boîte de Pétri :

Salières 1,2,3,5,6,7 et 8 :solution de phosphates M/15 pH7)

Salière 4:solution d'antibiotiques(1.000u/ml de pénicilline

+ 100 γ/ml de streptomycine).

Lorsque les contrôles de stérilité sont nettement négatifs, les Nématodes axénisés sont utilisés comme point de départ de la culture axénique continue.

Le maintien de l'axénisation exige, comme nous l'avons dit, que toutes les manipulations concernant les Nématodes se déroulent en conditions parfaitement stériles. Les repiquages de la souche et les expériences se déroulent dans une chambre stérilisée aux ultra-violets ; la verrerie est passée pendant 30 minutes au four Pasteur à 180° C et les liquides utilisés (milieu d'élevage, solutions tamponnées) sont stérilisés, selon leur nature, par autoclavage ou filtration. Des contrôles de stérilité sont effectués périodiquement sur de petites quantités de milieu prélevées dans les élevages en cours. Ces prélèvements sont obligatoires, car le plus souvent le milieu d'élevage, très riche en protéines, floccule à 20° C, ce qui risque de masquer un trouble dû aux développements bactériens.

2) Fabrication du milieu d'élevage

Les milieux utilisés pour les cultures axéniques de C. briggsae ont fait l'objet de nombreuses recherches (DOUGHERTY et al., 1959). Il ressort de ces études que les milieux chimiquement définis ne permettent la culture continue de ce Nématode qu'à la condition d'être enrichis en extraits de foie ou d'embryons de Poulet (NICHOLAS et al., 1959). Les animaux élevés pour nos expériences ont été cultivés dans un milieu liquide appelé "milieu complet", qui est constitué d'une fraction chimiquement définie et d'une fraction extraite du foie de cheval.

a) La composition de la fraction chimiquement définie employée est celle du milieu de base GM 11 (Gordon Medium) légèrement modifiée par ROTHSTEIN en 1962. Ce milieu contient de la peptone de soja, des précurseurs d'acides nucléiques, une source carbonée (le D-glucose), des traces de vitamines, des sels minéraux et organiques (tableau 1). Les solutions concentrées, préparées à partir de chaque groupe de substances, sont conservées à - 20° C. Au moment de la fabrication du milieu, les différentes solutions sont prélevées en quantité voulue, mélangées et amenées à la concentration finale par addition d'eau distillée. Le pH est ajusté à 5,8 et le milieu est

I - Peptones	40.000 mg/l	IV - Sels	
II - Acides nucléiques		$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	1225,5 mg/l
acide adénylique	347 mg/l	KOH	925,5 -
- cytidylique	323 -	MgH citrate $5\text{H}_2\text{O}$	915 -
- guanylique	363 -	Cl_2Ca , $2\text{H}_2\text{O}$	220 -
- uridylique	324 -	K_3 citrate	486 -
thymine	126 -	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, $6\text{H}_2\text{O}$	58,8 -
III - Vitamines		Cl_2Mn , $4\text{H}_2\text{O}$	22,2 -
n acétylglucosamine	15 mg/l	Cl_2Zn	10,2 -
DL alanine	15 -	Cl_2Cu , $2\text{H}_2\text{O}$	6,5 -
cyanocobalamine	3,75 -		
folinate de Ca	3,75 -		
nicotinamide	7,5 -		
acide nicotinique	7,5 -		
panthothénate de Ca	7,5 -		
pyridoxal ClH	3,75 -		
pyridoxamine 2 ClH	3,75 -		
pyridoxine ClH	7,5 -		
riboflavine	7,5 -		
thiamine	7,5 -		
acide p-aminobenzoïque	7,5 -		
biotine	3,75 -		
acide folique	7,5 -		
DL acide thioctique	3,75 -		
		V - Source carbonée	
		D-glucose	1315 mg/l
		VI - Autres composés	
		Glutathion	408 -
		Chlorure de choline	885 -
		i-inositol	648 -

TABEAU 1 - COMPOSITION DU MILIEU CHIMIQUEMENT DEFINI UTILISE POUR LA CULTURE AXENIQUE

DE CAENORHABDITIS BRIGSSAE

réparti en petites fractions avant d'être congelé.

b) L'extrait de foie est préparé à partir d'un foie de cheval recueilli dans un bac de glace immédiatement après l'abattage et traité aussitôt. Le foie est broyé ; l'homogénat est chauffé par fractions au bain-marie à 53° C pendant 6 minutes. Les constituants précipités par la chaleur sont éliminés par centrifugation à 18000 tours/mn pendant 30 minutes.

Le surnageant est réparti dans des flacons et congelé à - 20° C.

La stérilisation des deux fractions du milieu complet est faite séparément, sur de petites quantités.

- 10 ml du milieu défini sont répartis à raison de 1 ml par tube à essais ; ces tubes sont bouchés au coton, et autoclavés 15 minutes entre 80° C et 100 ° C, trois fois de suite.
- la stérilisation de l'extrait de foie est faite par filtration sous pression sur un filtre Seitz équipé d'une plaque filtrante Seitz EKS II.

Des contrôles de stérilité sont effectués sur les deux fractions avant de les réunir. L'extrait de foie et le milieu défini sont ensuite mélangés dans le rapport de 1 à 9. Le milieu complet ainsi obtenu est enfin réparti aseptiquement dans les petits tubes d'élevage (70 mm sur 10 mm). Chaque tube, préalablement stérilisé et fermé par un bouchon de polyvinyl, reçoit 0,15 ml de milieu complet.

3) Les repiquages

Nous nous sommes efforcés de standardiser au maximum la culture pour réduire les facteurs de variabilité. Dans ce but, les tubes d'élevage sont ensemencés avec des larves prélevées dans une salière de solution tamponnée, où de jeunes adultes ont pondu pendant 24 heures à 20° C ; ces larves ont donc le même âge à 24 heures près. Arbitrairement, leur âge est compté à partir du moment où elles sont repiquées, à raison de 15 par tube, dans le milieu d'élevage. Elles deviennent adultes à 20° C au bout de 7 jours et pondent les premiers oeufs. Chaque tube d'élevage est défini par certaines

caractéristiques : le numéro du tube des parents, l'âge des larves, la date du repiquage dans le tube de culture, et la date d'apparition des premiers descendants. On dispose ainsi pour les expériences et les repiquages de la souche, d'animaux dont l'âge et l'origine sont bien déterminés.

C - TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES

1) Technique d'incubation radioactive

Dans la plupart des cas, la fourniture de la thymidine tritiée (New England Nuclear Corporation, act. spéc. 6,4 curie/mM) s'est faite suivant le même procédé : les Nématodes sont prélevés de leur tube d'élevage, rincés dans plusieurs bains de solution tamponnée (M/15 - pH 7) et introduits dans les tubes contenant le milieu d'incubation. La thymidine tritiée (TdR-H₃) est ensuite ajoutée aseptiquement et répartie de façon uniforme par simple agitation. Les tubes sont replacés à 20°C.

Dans un cas particulier d'incubation en milieu complet, la TdR-H₃ a été ajoutée directement dans le tube d'élevage des Nématodes sans renouvellement du milieu. Cette expérience a été engagée pour étudier l'influence éventuelle du transfert des animaux sur l'incorporation de la TdR-H₃.

La confection des frottis a lieu soit à la fin de l'incubation radioactive, soit après une postincubation de 30 ou 48 heures en milieu non radioactif, faisant suite à une incubation radioactive.

Le passage des Nématodes du milieu d'incubation au milieu de postincubation se fait après quatre rinçages dans la solution tamponnée. Les nombreux rinçages ont pour but d'éliminer au maximum la TdR-H₃ et d'empêcher que son incorporation se poursuive pendant la postincubation. On a calculé que ces rinçages provoquent une dilution d'environ 2000 fois de la TdR-H₃ ajoutée au départ.

2) Techniques histologiques

La technique du frottis utilisée dans ce travail est celle mise au

point par NIGON (1949) sur C. elegans. Chaque Nématode est prélevé de son tube d'élevage, rincé plusieurs fois dans une solution de ClNa 7 ‰ pour éliminer le milieu, et placé sur une lame de préparation dans une goutte de cette solution physiologique. On pratique une section transversale au milieu du corps à l'aide d'une lame de rasoir montée dans un mandrin. Du fait de la turgescence de l'animal, l'une ou les deux glandes génitales et l'intestin sont expulsés. Les organes sont ensuite disposés afin d'éviter la superposition, puis étalés et desséchés par aspiration du liquide physiologique. Un bon étalement est une condition essentielle pour l'utilisation de la technique autoradiographique. La dessiccation achevée, une goutte de fixateur (sublimé acétique : solution saturée de $\text{Cl}_2 \text{ Hg}$ + 5% d'acide acétique) est déposée sur le frottis, ce qui augmente son adhérence sur la lame. Les frottis sont plongés 10 minutes dans le fixateur et laissés une nuit dans l'alcool iodé 95°. Après rinçage à l'eau ordinaire, ils sont hydrolysés par ClH Normal pendant 10 minutes à 57° C et colorés par la méthode de Feulgen pendant 2 heures.

Certains frottis ont été traités par les enzymes spécifiques des acides nucléiques. La DNase et la RNase (Fluka) sont dissoutes à raison de 10% dans une solution de SO_4M $4 \times 10^{-2}\text{M}$ tamponnée à pH 7,5. Les hydrolyses sont effectuées à 37° C pendant 2 h 30 pour la RNase et 7 h pour la DNase. Certaines lames ont été traitées successivement par les deux enzymes ; d'autres, les témoins, sont restés pendant la même durée dans la solution tamponnée dépourvue d'enzymes.

3) Technique autoradiographique

La technique autoradiographique employée est celle de PELC (1956). Les frottis sont recouverts d'une émulsion photographique pelliculable KODAK AR 10. L'exposition des lames, à 4° C, a duré deux semaines pour les incubations longues et moyennes, trois semaines pour les incubations courtes. Le développement des lames est effectué par un révélateur à base de génol et d'hydroquinone, pendant 20 minutes. Après 20 minutes de fixation, les lames sont colorées au vert Lumière.

Les marquages se traduisent par la présence de grains d'argent noirs situés au-dessus des organes ayant incorporé la thymidine- H_3 . Ils ont été

étudiés en fonction de la topographie de l'animal et de l'intensité de l'incorporation de la TdR-H₃. Le comptage des grains n'étant pas possible sur notre matériel, nous avons établi une échelle arbitraire d'intensité de marquage (figure 3), qui nous a permis de comparer nos résultats d'une expérience à l'autre.

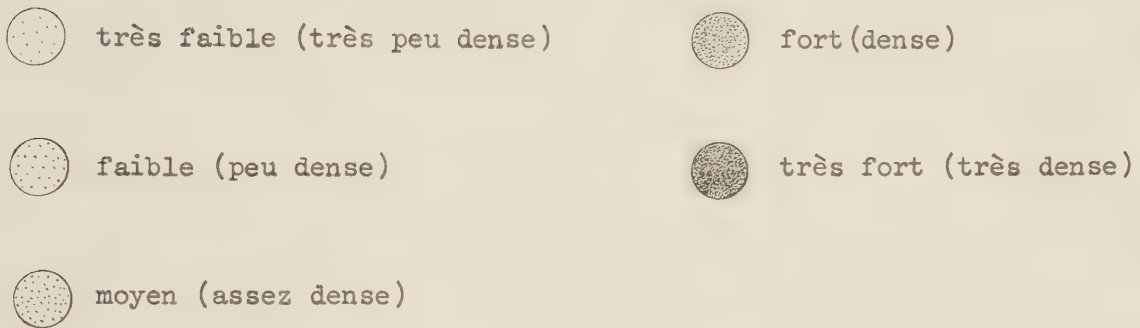


FIGURE 3 - ECHELLE D'INTENSITE DES MARQUAGES NUCLEAIRES ,
entre parenthèses, intensité correspondante
des marquages cytoplasmiques.

CHAPITRE II

INCORPORATION DE LA THYMIDINE TRITIÉE

Les caractères généraux de l'incorporation sont indépendants des conditions de l'incubation. La TdR-H₃ ne s'incorpore pas dans tous les noyaux : seuls les noyaux des cellules germinales et parfois ceux des cellules du tube ovarien peuvent présenter un marquage ; les noyaux de l'intestin en particulier ne montrent jamais d'incorporation. De plus, dans de nombreux types d'expérience, un marquage non spécifique, appelé marquage cytoplasmique, est observé sur les différents organes, à côté du marquage nucléaire.

Le marquage nucléaire s'est révélé sensible à la DNase et résistant à la RNase, prouvant ainsi que la thymidine tritiée s'incorpore bien dans l'ADN. Le marquage cytoplasmique résiste à l'action séparée et successive des deux enzymes et sa nature n'a pas été déterminée.

D'autres caractères de l'incorporation varient, au contraire, avec le milieu d'incubation, la quantité de TdR-H₃ et la durée de son action. Nous décrirons et comparerons les résultats obtenus avec les deux milieux les plus utilisés : milieu d'élevage et solutions salines tamponnées. Nous verrons aussi les résultats, moins nombreux, obtenus avec l'extrait de foie et l'eau distillée.

A - INCUBATIONS EN MILIEU D'ELEVAGE

La TdR-H₃ a été ajoutée selon les expériences en concentration faible

(30 $\mu\text{c/ml}$ de milieu d'incubation) ou forte (de 100 à 250 $\mu\text{c/ml}$). La durée des incubations a varié de 1 h 30 à huit jours avec des intermédiaires de 5 h, 17 h, 24 h et 42 h. Les animaux incubés sont de jeunes adultes de 7 à 8 jours, excepté pour les incubations de 8 jours qui sont faites avec des larves venant d'éclore.

1) Lorsque l'on emploie une forte dose de TdR- H_3 (de 100 à 250 $\mu\text{c/ml}$) les caractéristiques du marquage varient avec la durée de l'incubation :

- quand l'incubation ne dépasse pas 2 heures, le marquage se localise sur les noyaux des gonies situées à l'extrémité apicale de la gonade. Il est d'intensité faible à moyenne. On remarque en outre l'absence totale de marquage cytoplasmique (figure 4 a).

- après 5 heures d'incubation on observe, sur les différents organes, un marquage cytoplasmique assez dense. Sur la gonade, dans la plupart des cas, ce marquage masque le marquage nucléaire (figure 4 b) et ce dernier n'est bien visible que sur certaines lames.

- après 17 heures d'incubation, la zone des gonies marquées s'étend et correspond en moyenne au cinquième de la longueur du tube génital. L'intensité du marquage nucléaire est suffisante pour dominer nettement le marquage cytoplasmique qui est présent sur toute la gonade comme dans le cas précédent (figure 4 c).

- après 24 heures d'incubation, les gonies marquées sont plus nombreuses qu'après 17 heures ; elles occupent environ le quart de la gonade (figure 4 d). Le prolongement de l'incubation permet à l'intensité du marquage d'augmenter à tel point que parfois les grains de l'émulsion forment sur les noyaux marqués des plages circulaires, entièrement noires. Dans les incubations de 24 heures, il n'y a pas d'augmentation sensible de l'intensité du marquage quand la quantité de TdR- H_3 passe de 100 μc à 250 $\mu\text{c/ml}$.

- quand le développement des larves a lieu dans le milieu tritié (incubation de 8 jours), les adultes obtenus présentent des marquages cytoplasmique et nucléaire très forts. Le marquage cytoplasmique, qui recouvre tous les organes, laisse apparaître, dans les cas favorables, des îlots de marquage massifs sur les gonies de l'apex. On doit noter cependant que les

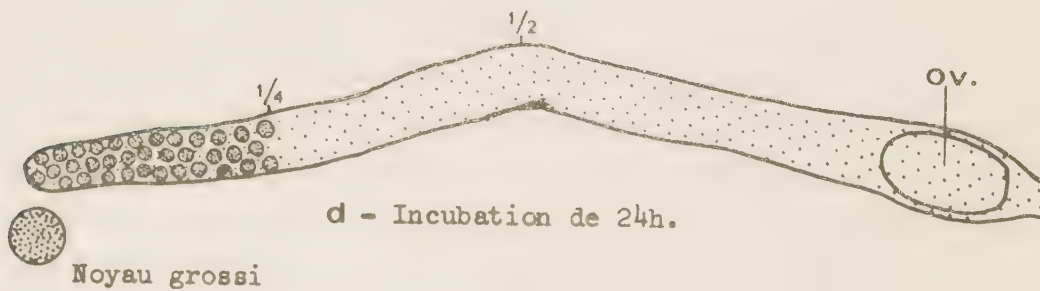
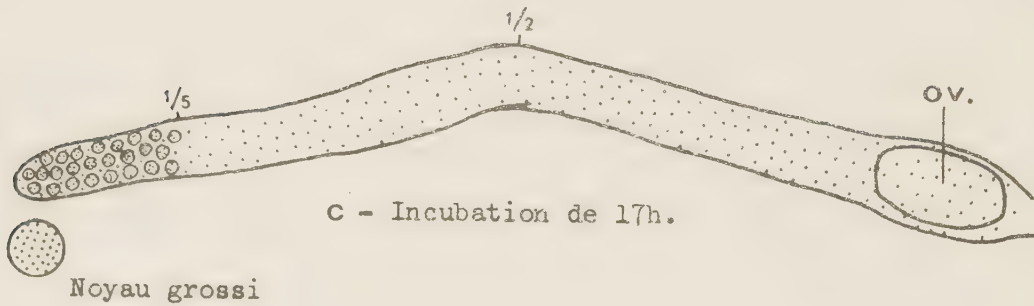
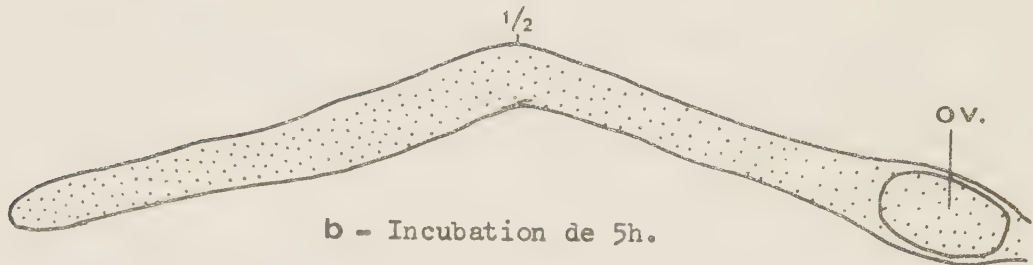
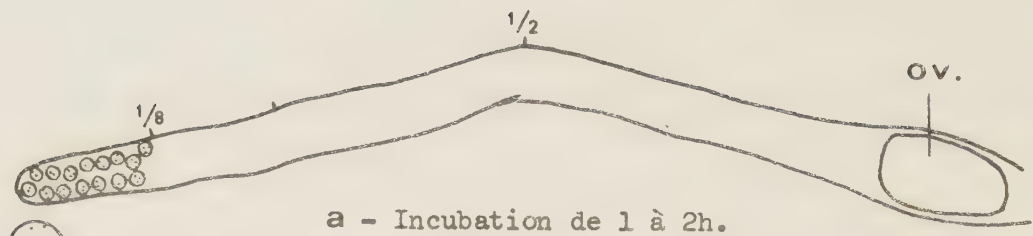


Fig. 4 .- Localisation des marquages nucléaires et cytoplasmique en fonction de la durée d'incubation : concentration de TdR- H_3 = 100 à 250 μ c/ml.

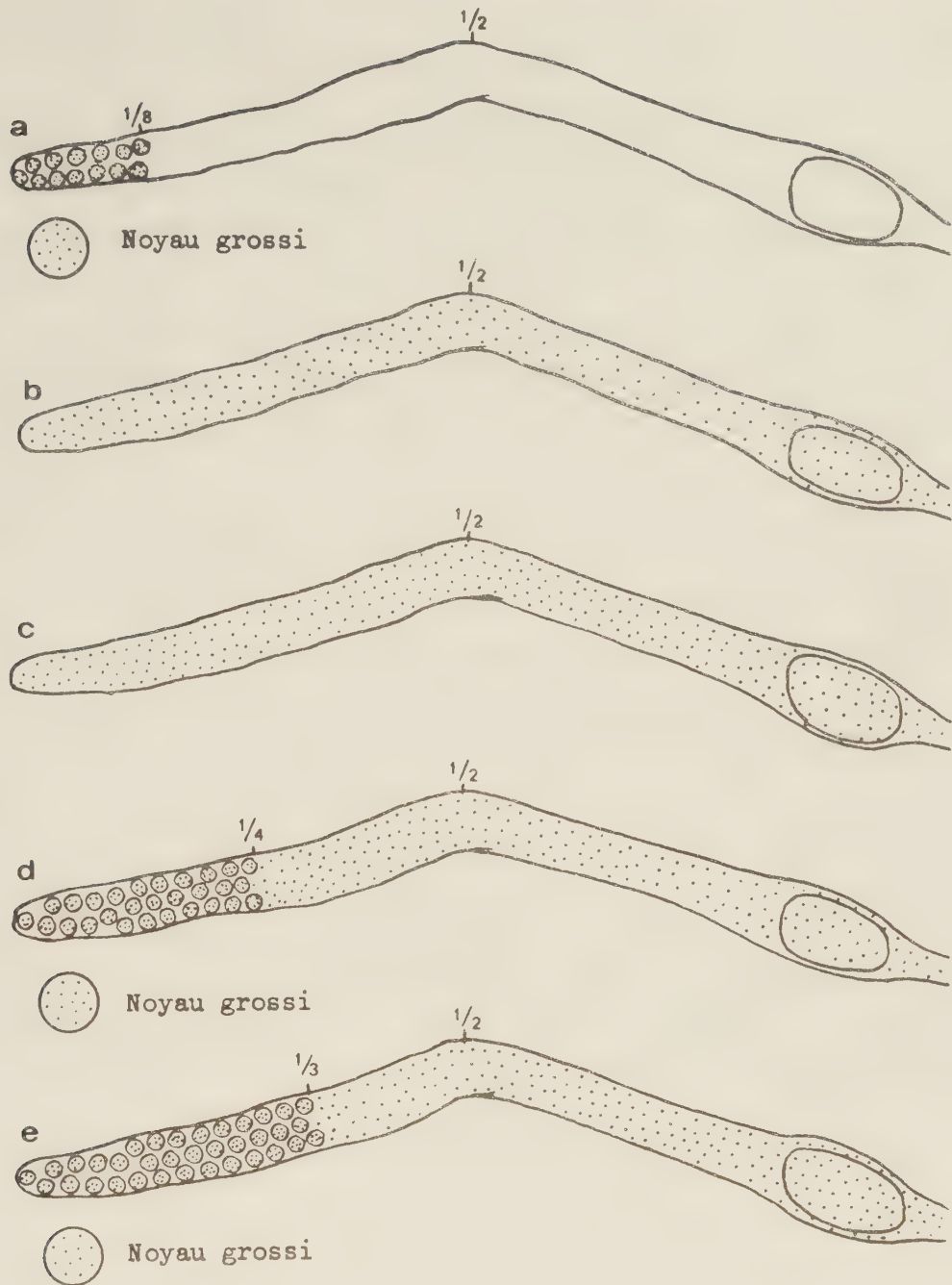


Fig.5.— Localisation des noyaux marqués et du marquage cytoplasmique en fonction de la durée de l'incubation.

Concentration de $\text{TdRH}_3 = 30 \mu\text{c/ml}$.

Durée des incubations: a= 1 à 2h., b= 5h., c= 17h., d= 24h., e= 42h.

marquages obtenus n'ont pas toujours atteint une intensité aussi élevée.

2) Lorsqu'on emploie de faibles doses de TdR- H_3 (30 $\mu\text{c/ml}$), la zone des marquages nucléaires de la gonade s'allonge proportionnellement à la durée de l'incubation. Elle passe du huitième au tiers de la longueur totale de la gonade, quand la durée de l'incubation passe de 1 h 30 à 42 heures, (figure 5). Le marquage cytoplasmique n'apparaît qu'après 5 heures d'incubation. Son intensité est moyenne de même qu'après une incubation de 17 heures, mais elle est faible lorsque l'incubation dure 24 heures et plus.

3) Lorsque, contrairement aux expériences précédentes, les Nématodes ne sont ni rincés, ni repiqués dans un milieu renouvelé, et que la TdR- H_3 est ajoutée directement dans le tube d'élevage, les caractéristiques de l'incorporation sont très peu modifiées. Pour une quantité donnée de thymidine H_3 - forte ou faible - la localisation des marquages reste la même tandis que leur intensité semble augmenter légèrement.

4) En résumé, la présence d'un marquage de caractère diffus empêche, dans certaines expériences, de localiser et d'apprécier le marquage des noyaux. C'est surtout le cas des expériences d'incubation de 5 heures ou 17 heures. Dans tous les autres cas, le marquage nucléaire est nettement appréciable et les résultats sont homogènes au sein d'une même expérience. Ces résultats permettent de conclure que :

a) le nombre des cellules germinales marquées au cours d'une incubation tritiée est indépendant de la quantité de TdR- H_3 ajoutée et croît avec la durée d'incubation (tableau 2).

b) pour les durées d'incubation supérieures à 5 heures, l'intensité des marquages nucléaire et cytoplasmique augmente avec la quantité de TdR- H_3 . Cette augmentation est considérable entre 30 et 100 $\mu\text{c/ml}$. Elle est moins importante quand la quantité de précurseur passe de 100 à 250 $\mu\text{c/ml}$ (tableau 3).

c) l'intensité des marquages est aussi fonction de la durée de l'incubation à condition que la quantité de TdR- H_3 soit élevée (100 à 250 $\mu\text{c/ml}$). Elle n'augmente pas sensiblement quand l'incubation est faite en

Durée de l'incubation	Rapport de la longueur marquée à la longueur totale de la gonade	
	TdR-H ₃ : 30 µc/ml	TdR-H ₃ : de 100 à 250 µc/ml
de 1 h à 2 h	de 1/8 à 1/6	de 1/8 à 1/6
5 h	non appréciable	non appréciable
17 h	1/5	1/5
de 20 h à 26 h	1/4	1/4
42 h	1/3	
47 h	1/2	

TABLEAU 2 : LOCALISATION DU MARQUAGE NUCLEAIRE DANS LA GONADE EN FONCTION DE LA DUREE D'INCUBATION ET DE LA QUANTITE DE TdR-H₃ AJOUTEE.

Durée de l'incubation	TdR-H ₃ : 30 µc/ml		TdR-H ₃ : 200 µc/ml	
	marquage nucléaire	marquage cytoplasmique	marquage nucléaire	marquage cytoplasmique
de 1 h à 2 h	faible	nul	faible à moyen	nul
5 h	non appréc.	assez dense	non appréc.	assez dense
17 h	non appréc.	assez dense	moyen	assez dense
24 h à 26 h	faible	peu dense	fort	assez dense
42 h à 47 h	faible	peu dense		
8 jours			très fort	très dense

TABLEAU 3 : INTENSITE DES MARQUAGES NUCLEAIRE ET CYTOPLASMIQUE EN FONCTION DE LA DUREE D'INCUBATION ET DE LA QUANTITE DE TdR-H₃ AJOUTEE.

présence de 30 $\mu\text{C}/\text{ml}$ de précurseur (tableau 3).

d) les rinçages et les transferts des Nématodes avant l'incubation tritiée ne modifient pas les caractéristiques de l'incorporation.

B - INCUBATIONS RADIOACTIVES DANS D'AUTRES MILIEUX

1) L'incorporation de la TdR- H_3 dans des milieux autres que le milieu d'élevage a été étudiée avec de faibles quantités de précurseur. Les incubations dans l'eau distillée n'ont jamais permis d'obtenir un marquage même faible. Les incubations effectuées dans l'extrait de foie ont donné des résultats d'incorporation positifs. Le marquage nucléaire obtenu est toujours faible et intéresse la même catégorie de cellules qu'en milieu d'élevage. Dans ces deux milieux d'incubation la zone des gonies marquées s'allonge avec la durée de l'incubation ; le marquage cytoplasmique est peu dense.

2) Quand l'incubation a lieu dans une solution saline tamponnée l'intensité de l'incorporation de la TdR- H_3 est très variable suivant la nature de la solution employée. Les solutions testées diffèrent soit par les phosphates soit par la concentration molaire.

a) L'effet de la nature des phosphates sur l'incorporation a été étudié en comparant les résultats obtenus avec des solutions salines :

- de phosphates disodique et monopotassique M/15, pH 7 (a)
- de phosphates mono- et disodique M/15, pH 7 (b)
- de phosphates mono- et bipotassique M/15, pH 5,8 (c)

- Après une incubation de 2 h dans la solution (c) on n'obtient pas de marquage. Dans les autres solutions, 75% des Nématodes incorporent de la TdR- H_3 . Avec la solution (a) le marquage nucléaire est moyen et le marquage cytoplasmique faible. Avec la solution (b) les deux marquages sont faibles (tableau 4).

- Après une incubation de 24 heures dans la solution (c), c'est-à-dire dans la solution de phosphates mono- et bipotassique, le mar-

Nature de la solution	Durée de l'incubation tritiée : 2 heures		24 heures	
	marquage nucléaire	marquage cytoplasmique	marquage nucléaire	marquage cytoplasmique
Solution (a) $\text{PO}_4\text{HNa}_2 + \text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ M/15 - pH 7	moyen	peu dense		
Solution (b) $\text{PO}_4\text{HNa}_2 + \text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ M/15 - pH 7	faible	peu dense		
Solution (c) $\text{PO}_4\text{HK}_2 + \text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ M/15 - pH 5,8	nul	nul	très fort	peu dense

TABLEAU 4 : INTENSITE DES MARQUAGES NUCLEAIRE ET CYTOPLASMIQUE APRES INCUBATION DANS LES SOLUTIONS DIFFERENTES DE PHOSPHATES.
(TdR- H_3 : 30 $\mu\text{c/ml}$)

quage nucléaire est, de façon constante, beaucoup plus intense qu'après incubation de même durée dans le milieu d'élevage. Les gonies marquées sont moins nombreuses dans le premier milieu et n'occupent que le huitième ou le sixième de la longueur de la gonade, au lieu du quart dans le deuxième milieu.

b) pour étudier l'effet de la concentration saline sur l'incorporation de la TdR- H_3 , on a fait des incubations de 2 heures dans des solutions de phosphates mono- et disodique de pH 7, à différentes molarités : M/15 - M/30 - M/60. Les Nématodes supportent très bien des concentrations

comprises entre M/8 et M/60 ; ils survivent même plusieurs jours dans l'eau distillée. Comme le montre le tableau 5, les résultats d'incorporation ne sont pas homogènes au sein d'une même expérience. Les marquages, lorsqu'ils existent, sont généralement d'intensité faible ou très faible.

Concentration molaire de la solution	% des frottis présentant une incorporation nette	Marquage nucléaire	Marquage cytoplasmique
M/15	75%	très faible	peu dense
M/30	10%	faible	peu dense
M/60	25%	faible à moyen	peu dense

TABLEAU 5 : RESULTATS DE L'INCORPORATION APRES INCUBATION DANS DES SOLUTIONS DE PHOSPHATES DE MOLARITE DECREOISSANTE

3) En conclusion :

a) dans les incubations de deux heures en solutions tamponnées, l'intensité du marquage semble varier avec la nature des phosphates choisis. Un bon marquage nucléaire est obtenu avec la solution de phosphates mono-potassique et disodique (M/15 - pH 7).

b) dans les incubations en solution de phosphates mono- et bipotassique (M/15 - pH 5,8), l'intensité du marquage varie avec la durée de l'incubation. Elle est nulle après 2 heures mais devient massive quand l'incubation se prolonge pendant 24 heures.

c) dans les incubations en solution de diverses molarités, les résultats sont hétérogènes suivant les animaux et ne permettent pas de conclure sur l'effet éventuel de la concentration molaire dans l'incorporation de la TdR-H₃ chez C. briggsae.

d) enfin il faut noter que pour deux modalités d'expériences - incubation de 2 heures dans la solution (b) et incubation de 24 heures dans la solution (c) - l'intensité de l'incorporation nucléaire est nettement supérieure à celle qu'on obtient en milieu d'élevage avec la même quantité de précurseur (30 $\mu\text{c/ml}$). Elle est même comparable à celle obtenue en milieu d'élevage avec une quantité de TdR- H_3 six fois plus grande (200 $\mu\text{c/ml}$).

C - DISCUSSION

Dans l'incorporation de la TdR- H_3 chez C. briggsae, élevé en culture axénique, deux aspects méritent plus particulièrement d'être discutés :

- d'abord la présence sur tous les organes d'un marquage cytoplasmique uniforme,

- ensuite l'obtention, pour des conditions d'incubation rigoureusement identiques, d'un marquage nucléaire plus intense dans une solution de phosphates tamponnée que dans le milieu d'élevage.

1) Marquage cytoplasmique

a) Bibliographie

L'existence d'un marquage cytoplasmique qui, dans nos expériences, apparaît dès les premières heures d'incubation, n'est pas un fait isolé. En effet, l'obtention de marquages non nucléaires, après incubation dans la TdR- H_3 a déjà été rapportée par plusieurs auteurs travaillant sur des matériels très divers : Amoeba (PLAUT et SAGAN, 1958), Acetabularia (BRACHET, 1958), Tetrahymena (SCHERBAUM, 1960), Euglena (SCHER et SAGAN, 1962) ; les cultures de racines de Lis (TAKATS et SMELLIE, 1963) et de cellules de Mammifères (GIRGIS et VIEUCHANGE, 1964).

La nature de ces marquages cytoplasmiques a été identifiée dans certains cas grâce à l'hydrolyse par les enzymes spécifiques des acides nucléiques.

Certains de ces marquages disparaissent sous l'action de la DNase (PLAUT et SAGAN, 1958, SCHERBAUM, 1960, SCHER et SAGAN, 1962). Quelquefois ces marquages ont pu être reliés à la présence d'organites cytoplasmiques porteurs d'ADN comme les corpuscules Feulgen positifs de Amoeba (RABINOVITCH et PLAUT, 1962), les chloroplastes d'Euglena (SCHER et SAGAN, 1962) et les organites ovulaires de Pteridium (BELL et MUHLETHALER, 1964). La spécificité de la TdR-H₃ comme précurseur de la molécule d'ADN n'est donc pas mise en question.

D'autres marquages cytoplasmiques sont résistants à la DNase, mais sensibles à la RNase. C'est le cas des marquages observés chez Paramecium aurelia en phase d'autogamie (BERECH et VAN WAGTENDONK, 1962).

D'autres enfin résistent, comme dans nos expériences sur Caenorhabditis briggsae, à la fois à la DNase et à la RNase. Des marquages de ce type ont été observés dans les cellules de racines de Lilium par TAKATS et SMELLIE (1963), dans celles de Vicia faba par WOODWARD et al. (1961).

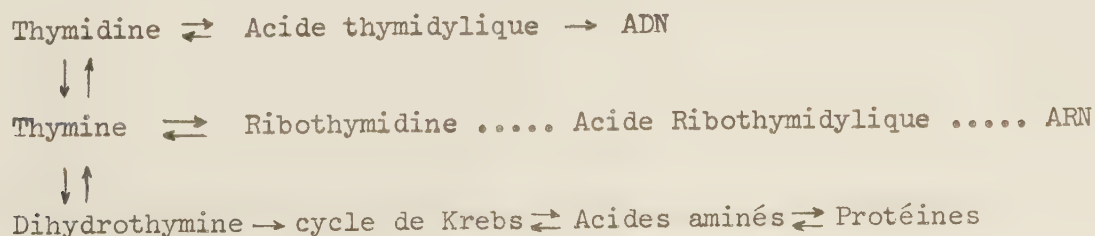
Le fait que ces marquages ne correspondent pas à une fixation dans l'ADN ou l'ARN a conduit plusieurs auteurs à s'interroger sur la spécificité de la TdR-H₃ et à chercher si ce précurseur ne subissait pas de dégradation avant son incorporation dans l'ADN. Ces auteurs ont réussi à prouver que la TdR-H₃ peut se dégrader spontanément dans la solution aqueuse de son flacon d'origine, et sous l'action des milieux biologiques auxquels elle est soumise pendant les expériences d'incubation.

α) La dégradation en solution aqueuse des composés organiques maintenus à la température ambiante est un phénomène bien connu ; cette dégradation chimique est accélérée par une augmentation de température. A cette dégradation chimique vient s'ajouter, lorsque les composés sont marqués par un isotope radioactif, une dégradation supplémentaire appelée : radiolyse (BAYLY et WEIGEL, 1960 ; EVANS et STANFORD, 1963 a ; APELGOT et ECKERT, 1963). La radiolyse résulte de l'irradiation des molécules par l'isotope radioactif. Elle a été bien étudiée en ce qui concerne la TdR-H₃ (APELGOT, 1961 ; EVANS et STANFORD, 1963 b ; APELGOT et al, 1963). La radiolyse peut provoquer la transformation du tritium en helium et par suite li-

bérer de la thymidine non radioactive. Elle peut aussi avoir pour effet de scinder la molécule de TdR-H₃ en thymine et désoxyribose. Ces deux produits peuvent ou non être marqués suivant la position initiale du tritium dans la molécule de thymidine. D'après EVANS et STANFORD (1963 b), les molécules de thymidine, thymine et désoxyribose ainsi libérées peuvent donner des réactions secondaires avec le solvant et former de nouveaux corps tritiés. Certains de ceux-ci ont été identifiés comme des peroxydes et des glycols de thymidine (APELGOT et al, 1963). Nous avons effectué des radiochromatographies de certains échantillons de TdR-H₃ utilisés pour nos expériences ; les résultats conduisent à penser que la radioactivité se répartit de la façon suivante : 60% dans la thymidine-H₃, 10% dans la thymine-H₃, et 30% dans des composés organiques non définis.

β) La dégradation de la thymidine en présence de milieux biologiques résulte de l'action des enzymes présentes dans ces systèmes. BAUGNET-MAHIEU et al (1964) ont observé, par exemple, que la thymidine-H₃ ajoutée à un extrait de foie en régénération n'est pas phosphorylée en totalité mais qu'une partie est vraisemblablement catabolisée par les enzymes cellulaires. Le catabolisme de la thymidine-H₃ donne naissance à divers corps tritiés, dont certains ont pu être identifiés. Ainsi, TAKATS et SMELLIE (1963) ont isolé de la thymine-H₃ du liquide d'incubation de racines de Lis mises en présence de thymidine-H₃. Ils ont observé dans les tissus de ces racines la présence des acides β-uréïdo- et β-aminoisobutyrique tritiés, déjà cités par FINK et al (1956) comme produits du catabolisme de la thymine.

Il est évident que les corps tritiés résultant du catabolisme de la thymidine-H₃ constituent une réserve de précurseurs, non spécifiques de l'ADN. On conçoit que ces précurseurs puissent être utilisés pour la synthèse de produits cellulaires tels que l'ARN, les protéines, etc... POTTER a proposé, en 1959, un schéma des différentes voies possibles du métabolisme de la thymidine et de ses dérivés :



Des résultats expérimentaux sont venus confirmer ce schéma. Ainsi, des auteurs ont observé que la fourniture de thymidine- H_3 provoque l'apparition de ribonucléotides marqués, précurseurs de l'ARN. Ces ribonucléotides, les acides uridylique et cytidylique, ont été isolés chez Acetabularia par BRACHET (1958), chez P. aurelia par BERECH et VAN WAGTENDONK (1962) et chez Cocos nucifera par ROYCHOUDHURY et SEN (1963). D'autres auteurs rapportent l'apparition, dans certains cas, d'acides aminés ou d'acides du cycle de Krebs marqués après fourniture de thymidine- H_3 . Ces corps pourraient constituer une étape conduisant à la synthèse des protéines.

γ) En résumé, on voit que la dégradation de la thymidine- H_3 conduit, quelle que soit sa nature, à la formation de corps radioactifs ou non, qui ont pour effets de diminuer l'activité spécifique de ce précurseur avant son emploi et de fournir aux cellules des produits radioactifs non spécifiques de l'ADN.

b) Caenorhabditis briggsae

Les données bibliographiques que nous venons de voir suggèrent immédiatement une explication possible des marquages cytoplasmiques obtenus chez C. briggsae. On peut imaginer en effet qu'ils résultent d'une dégradation de la thymidine tritiée s'effectuant selon les voies dont nous venons de parler.

Nous avons vu que la radiolyse de la TdR- H_3 fournie a pour effet de constituer un pool assez important de substances diverses, en particulier de thymine. La TdR- H_3 ajoutée à une solution de phosphates tamponnée fournit après quelques heures un radiochromatogramme pratiquement identique à celui de l'échantillon lui-même : celui-ci ne subit donc pas, dans la solution saline, d'altérations supplémentaires.

En revanche, la présence d'un extrait de foie conduit à une transformation rapide du précurseur. En effet, après 2 h 30 de séjour dans le milieu d'élevage - à base d'extrait de foie - le radiochromatogramme révèle une augmentation considérable de la quantité de thymine qui représente désormais 57% de la radioactivité totale. La fraction de produits non définis constitue environ 36%, tandis que la TdR- H_3 porte au maximum 7% de la radioactivité. Ces proportions sont sensiblement identiques lorsque le séjour dure 19

heures. Des analyses reprises dans les mêmes conditions, mais en présence de Nématodes, ont conduit à des résultats identiques. On en conclut que les enzymes contenues dans l'extrait de foie provoquent effectivement une dégradation très importante de la TdR-H₃ fournie. Il en résulte l'apparition de thymine-H₃ qui, en se dégradant elle-même, peut être à l'origine des marquages cytoplasmiques résistant à la DNase.

Cependant, si l'extrait de foie était le seul responsable de la dégradation de la TdR-H₃, les marquages cytoplasmiques ne devraient pas apparaître lorsque les animaux sont incubés dans la solution de phosphates. Or, nous avons vu que dans ce cas les marquages cytoplasmiques sont visibles et d'intensité peu élevée. Cette fraction du marquage cytoplasmique doit s'expliquer soit par une dégradation préalable de la TdR-H₃ fournie, soit par une transformation qu'elle subirait dans l'organisme lui-même.

2) Marquage nucléaire

Nous avons vu que les incubations de 24 heures en présence de 30 µc/ml de TdR-H₃ donnent un marquage nucléaire beaucoup plus intense lorsqu'elles sont faites en solution de phosphates que lorsqu'elles se déroulent dans le milieu d'élevage.

L'influence de plusieurs facteurs peut être envisagée. Nous en considérerons trois, soit :

- le taux de dégradation de la thymidine-H₃,
- la teneur en thymine froide,
- la concentration molaire et la présence de certains ions.

a) le taux de dégradation de la TdR-H₃

La dégradation est importante en milieu d'élevage à cause de la présence de l'extrait de foie qui provoque, en moins de 2 heures, la transformation de plus de 80% de la TdR-H₃ en thymine-H₃. Dans une solution de phosphates au contraire, la dégradation reste peu importante. Ceci peut expliquer qu'on obtienne pour une quantité de TdR-H₃ donnée, un taux d'incorporation nucléaire plus élevé dans la solution de phosphates, où la quantité de TdR-H₃ réellement disponible est beaucoup plus grande, que dans le milieu

d'élevage.

L'apport de quantités plus élevées de TdR-H₃ dans le milieu d'élevage semble conduire à une augmentation parallèle de la quantité de TdR-H₃ effectivement disponible, compte tenu de la dégradation. Corrélativement, les marquages obtenus sont plus forts ce qui indique que la capacité d'incorporer la TdR-H₃ n'est pas saturée. Cette observation conduit à des conclusions parallèles à celles qui viennent d'être énoncées : le marquage plus intense obtenu après incubation dans la solution de phosphates peut résulter simplement de la présence effective d'une quantité de TdR-H₃ plus élevée.

b) la teneur en thymine froide

Dans l'état actuel des connaissances, il paraît peu vraisemblable que la thymine soit incorporée dans la molécule d'ADN. Cependant cette hypothèse ne peut être totalement écartée. Dans ce cas, la présence de thymine (126 mg/l) dans la composition du milieu d'élevage peut constituer un autre facteur susceptible de modifier l'intensité des marquages nucléaires. Cette thymine, en diluant la thymine tritiée formée à partir de la TdR-H₃, pourrait contribuer à affaiblir la fraction des marquages attribuée à l'incorporation de thymine tritiée. Bien entendu, aucune dilution analogue ne peut avoir lieu dans la solution de phosphates.

c) effet des ions

Les données du tableau 4 indiquent que l'incorporation conduit à des résultats variables selon la nature des ions présents. Le milieu d'élevage contient, sans compter les peptones, 610 mM/l, dont 11 mM/l de sels minéraux ; alors que la solution de phosphates contient 66 mM/l. La nature des ions et leur concentration dans le liquide d'incubation pourraient éventuellement exercer une influence sur la perméabilité de certaines membranes. C'est ainsi que LOEFLER et JOHNSTON (1964) ont montré que, dans les oeufs de Batraciens, l'incorporation de la TdR-H₃ diminue quand la concentration saline du liquide d'incubation décroît ; dans l'eau distillée, elle est nulle.

Ainsi, chacune de ces trois catégories de facteurs : dégradation de

la TdR-H₃, incorporation de la thymine radioactive, nature et concentration des ions, peut intervenir pour expliquer les différences d'intensité du marquage suivant la nature du milieu d'incubation choisi. Dans l'état actuel des choses, de nombreuses expériences seraient nécessaires pour vérifier ces hypothèses et délimiter la part de responsabilité de chacun des facteurs. Il paraît cependant très vraisemblable que le premier d'entre eux surtout joue un rôle particulièrement important.

CHAPITRE III

EVOLUTION DU MARQUAGE PENDANT LES POSTINCUBATIONS EN MILIEU NON TRITIE

On étudie cette évolution en comparant aux témoins les résultats obtenus après postincubation. Les résultats témoins concernent les incubations tritiées ; ils ont été exposés dans le chapitre précédent. Les postincubations qui ont duré de 30 à 48 heures se sont déroulées soit dans le milieu d'élevage, soit dans une solution de phosphates tamponnée (M/15 - pH 7).

A - POSTINCUBATION EN MILIEU D'ELEVAGE

1) Après une postincubation en milieu d'élevage, la localisation des marquages nucléaires diffère essentiellement de celle des témoins (figure 6 a). La zone des gonies marquées ne se situe plus au niveau de l'apex, mais dans la région qui lui fait suite. Il en résulte la présence, à l'extrémité apicale, d'une zone plus ou moins importante où les gonies ne sont pas marquées. L'étendue de cette zone croît avec la durée de la postincubation : elle représente environ le quart du tube ovarien après 30 heures et le tiers après 40 heures de postincubation. La zone des cellules marquées qui lui fait suite présente du côté apical une limite peu définie car les cellules ne restent pas parfaitement groupées (figure 6 b). Au contraire, la limite de cette zone située du côté de l'orifice génital est bien individualisée. On lui a donné le nom de front de marquage.

La position du front de marquage est définie :

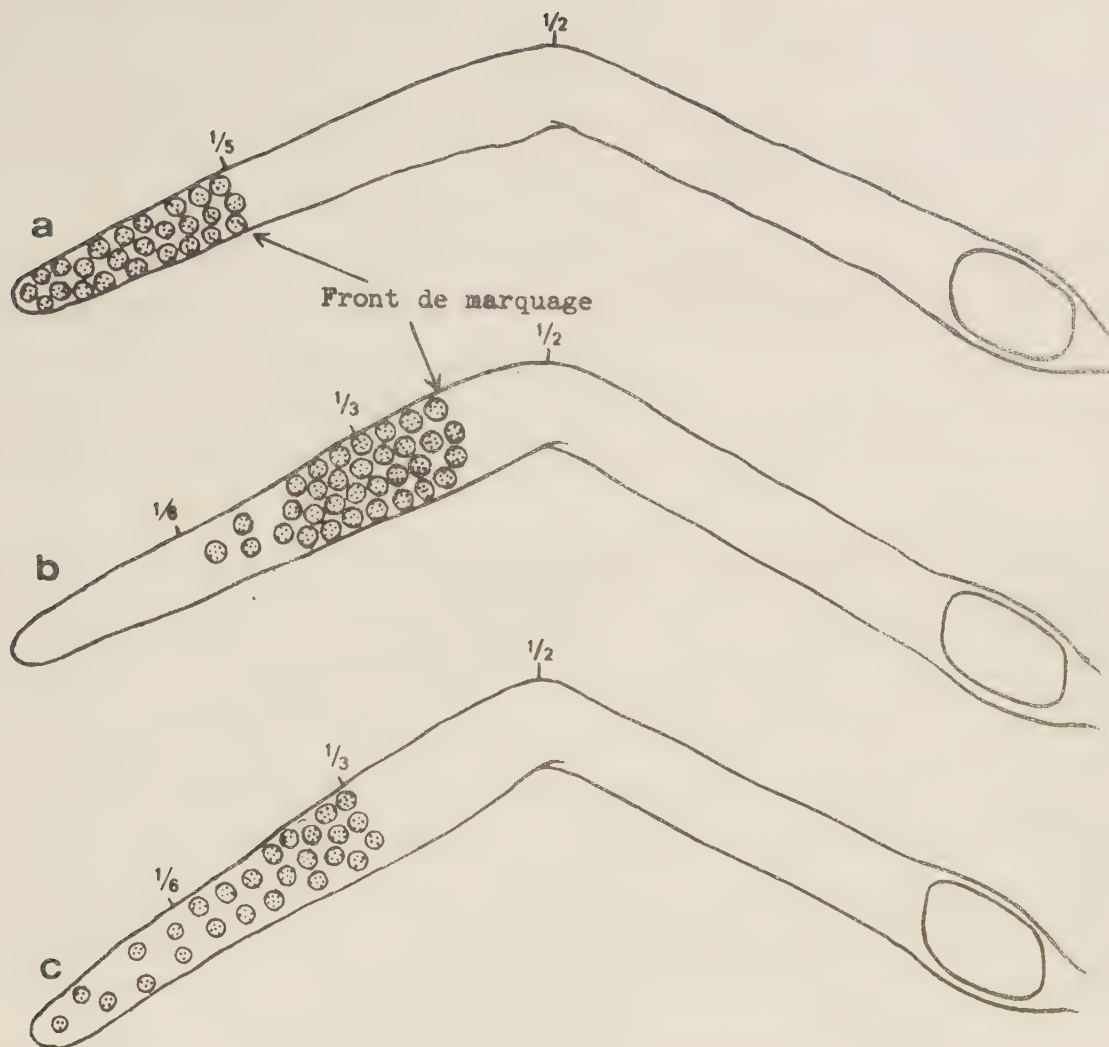


Fig.6.- Localisation des cellules marquées dans la gonade.

Incubation($100\mu\text{c/ml.}$) et postincubation en milieu non tritié.

a -17h.d'incubation ($100\mu\text{c/ml}$) : Témoin.

b -17h.d'incubation suivies de 30h.de postincubation dans le milieu d'élevage.

c -17h.d'incubation suivies de 30h.de postincubation dans la solution de phosphates.

a) par la longueur de la région marquée qui dépend de la durée de l'incubation dans le précurseur tritié,

b) par la longueur de la région apicale non marquée qui dépend de la durée de la postincubation.

L'emplacement du front de marquage résulte donc de la conjonction des deux éléments : durée de l'incubation et durée de la postincubation. Il est directement lié, en fait, à l'intervalle de temps qui sépare le début de l'incubation tritiée de la fin de la postincubation. Plus cet intervalle est long, plus la position du front de marquage est proche de l'orifice génital.

Par exemple, après une incubation tritiée de 17 heures, le front de marquage se situe au cinquième antérieur du tube génital. Quand cette incubation est suivie d'une postincubation de 30 heures, la nouvelle position du front de marquage, correspondant à une incubation de 47 heures ($= 17 \text{ h} + 30 \text{ h}$), se situe entre le tiers antérieur et le milieu de la gonade (figure 6 b). Il est intéressant de rappeler qu'après une incubation tritiée de 47 h le front de marquage atteint également ce niveau. On note aussi que 72 heures après le début d'une incubation le front de marquage se situe à l'extrémité distale du pachytène (figure 1) au niveau des ovocytes en cours de vitellogenèse.

2) L'intensité des marquages diminue de façon inégale au cours des postincubations en milieu d'élevage.

- Le marquage cytoplasmique s'affaiblit un peu sur le corps et sur l'intestin, tandis qu'il décroît considérablement au niveau des gonades. Cette atténuation permet de mettre en évidence, au cours de la postincubation, des marquages nucléaires qui étaient masqués, dans certaines expériences, par un marquage cytoplasmique trop dense.

- Le marquage nucléaire diminue également mais dans des proportions qui dépendent de la quantité de TdR-H₃ utilisée pour l'incubation et de la durée de la postincubation. Ainsi, la postincubation provoque une diminution très importante des marquages lorsque leur intensité est faible en fin d'incubation ; seule une zone très faiblement marquée persiste alors au

contact de la région apicale dépourvue de marquage. Au contraire, lorsque les marquages sont forts en fin d'incubation, la postincubation, quand elle dure 30 heures, a pour effet d'atténuer faiblement leur intensité ; la diminution d'intensité est plus nette après une postincubation de 48 heures.

Il est cependant possible que l'accroissement en volume des noyaux durant la postincubation suffise pour expliquer ces affaiblissements du marquage, car il en résulte inévitablement une densité moindre de l'ADN.

B - POSTINCUBATION EN SOLUTION DE PHOSPHATES

Les postincubations en solution saline n'aboutissent pas à des résultats rigoureusement identiques à ceux que nous venons de décrire pour les postincubations en milieu d'élevage.

On a repris l'expérience consistant à faire une incubation tritiée de 17 heures suivie d'une postincubation de 30 heures et on a effectué celle-ci en solution de phosphates. Nous avons constaté que le front de marquage est beaucoup moins avancé dans ce cas qu'après une postincubation de même durée en milieu d'élevage (figure 6 b et c). Les gonies marquées ne sont pas groupées dans une région subapicale non marquée. Elles se répartissent depuis l'extrémité apicale jusqu'à une limite située au niveau du tiers antérieur de la gonade ; elles sont séparées par des gonies non marquées. L'intensité de leur marquage décroît par rapport aux témoins dans les mêmes proportions qu'après une postincubation en milieu d'élevage.

En conclusion, les expériences de postincubation montrent un déplacement de la zone marquée en direction de l'orifice génital. Ce déplacement paraît moins important et moins homogène lorsque la postincubation s'effectue dans la solution de phosphates. De plus, les incubations ont pour conséquence d'affaiblir l'intensité des marquages de façon plus ou moins importante selon la quantité de TdR-H₃ utilisée pour l'incubation et selon la durée de la postincubation.

C - DISCUSSION ET INTERPRETATION

L'ensemble de nos résultats d'incubation et de postincubation semble

pouvoir être expliqué en partie par la physiologie de la glande génitale.

On sait grâce aux études de NIGON et BRUN (1955) que la courte région apicale couvrant environ le huitième de la gonade correspond à la zone du germigène et à la zone du synapsis. Elle est donc le siège d'une synthèse d'ADN liée aux divisions mitotiques et méiotiques. Les marquages observés dans cette région après des incubations brèves permettent de confirmer l'existence de cette synthèse.

On peut émettre deux hypothèses pour expliquer comment, à partir de cette zone apicale, le marquage s'étend et augmente d'intensité quand les durées d'incubation et de postincubation s'allongent.

- la première hypothèse consiste à supposer que pendant la migration des ovocytes une synthèse supplémentaire d'ADN se produit au-delà de l'apex, dans la zone du pachytène. Cette hypothèse semble peu vraisemblable, elle oblige en effet à admettre qu'en cas de postincubation le marquage est transféré du germigène au pachytène : un processus de dégradation au niveau de l'apex se trouvant exactement balancé par une incorporation correspondante au niveau du pachytène. Au surplus, on comprendrait mal comment ce processus se poursuivrait ensuite pour produire un déplacement régulier de la zone marquée vers l'extrémité distale de la gonade, à mesure que l'expérience se prolonge.

Une difficulté apparaît toutefois si l'on considère le cas où l'intensité des marquages croît en fonction de la durée de l'incubation. Ceci s'expliquerait simplement si l'on suppose que l'ensemble de la phase de marquage (zone des mitoses + début de la prophase méiotique) s'étend pour une cellule considérée sur une durée de l'ordre de 24 heures.

- la seconde hypothèse consiste à admettre au contraire que la synthèse d'ADN, et par suite le marquage des gonies, s'effectuent seulement à l'extrémité apicale de la gonade. L'extension ultérieure du marquage résulterait de la migration des gonies marquées, poussées vers l'orifice génital du fait de l'évolution de la gonade. Cette hypothèse nous retiendra plus longuement.

Elle nous amène à considérer les éléments qui interviennent dans l'évolution de la structure de la gonade. Ceux-ci sont de trois ordres :

1) Une multiplication cellulaire se déroule de façon continue dans le germigène ; en effet, on y trouve fréquemment des cellules en mitose. Les nouvelles cellules constituées à l'apex repoussent devant elles les cellules plus anciennes qui s'engagent dans la zone du pachytène en subissant les modifications nucléaires correspondantes.

2) Les cellules de la gonade situées en avant de l'apex évoluent selon un processus relativement synchrone qui conserve à la gonade sa structure régulière (figure 1). Cependant, le rythme d'évolution concernant les diverses zones de la gonade ne semble pas parfaitement identique pour chacune d'elles. Ainsi une discordance paraît exister entre le rythme de la multiplication des gonies dans le germigène et le rythme de passage des cellules au pachytène ; ce dernier semble plus rapide : il en résulte que l'importance relative du germigène diminue lorsque les animaux augmentent en âge. Il est possible qu'une discordance d'un autre type s'opère au niveau de la vitellogenèse, le nombre de cellules entrant en vitellogenèse, dans un intervalle de temps donné, restant inférieur au nombre de cellules qui ont pénétré dans la zone du pachytène pendant le même laps de temps. Cette seconde discordance pourrait contribuer à une augmentation relative du pachytène par rapport aux autres zones de la gonade.

3) A mesure que les animaux augmentent en âge, la taille de leurs cellules s'accroît. Cette croissance intéresse les cellules de la gonade, mais d'une façon très inégale selon les différentes zones. Ainsi la croissance cellulaire est relativement faible au niveau du pachytène, tandis qu'elle est considérable dans la partie distale de la gonade (stade de la diacinèse) où s'effectue la majeure partie de la croissance des ovocytes.

L'ensemble de ces processus conduit à des modifications progressives de la structure du tube ovarien. Seule une étude quantitative et détaillée de la population cellulaire à divers âges permettrait d'obtenir sur tous ces points une information sérieuse. Des dénombrements ont été effectués selon la technique de DELAVAILT (1957) sur des coupes sériées de gonades d'animaux âgés de 8 jours. Le temps a manqué pour faire cette étude sur des animaux plus âgés, ce qui aurait permis d'avoir une idée plus complète sur l'évolution des cellules ovariennes.

Dans l'état actuel des choses, nos observations permettent toutefois de préciser certains points :

1) La nature du milieu dans lequel se trouvent les animaux exerce une influence évidente sur l'évolution de la gonade. Ainsi on comprend facilement que les animaux placés dans une solution de phosphates soient le siège d'un métabolisme ralenti, par rapport à celui d'animaux placés dans le milieu complet. Effectivement on constate que dans la solution de phosphates, le déplacement du front de marquage est plus lent ; de plus la zone apicale non marquée ne se forme pas.

2) L'avancée du front de marquage semble se faire à la même vitesse au cours de l'incubation et de la postincubation. Ainsi le front de marquage atteint environ le même niveau après une incubation de 47 heures et après une incubation de 17 heures suivie d'une postincubation de 30 heures. La formation, dans ce dernier cas, d'une zone apicale non marquée s'explique par la formation de nouvelles cellules dans le germigène pendant la postincubation en milieu non radioactif.

3) Le front de marquage traverse la quasi totalité de la gonade en 80 heures environ. Cette observation nous amène à penser qu'une cellule née dans le germigène au temps 0 se trouvera moins de 80 heures après dans la phase de vitellogenèse. Les dénombrements effectués montrent que ces deux régions extrêmes de la gonade se trouvent séparées par environ 200 cellules qui sont au stade pachytène. Il semble donc que le débit d'une gonade puisse être estimé à 60 cellules par jour, dans les conditions de cultures employées (température à 20° C).

Cette dernière estimation conduit à une contradiction importante. On s'attendrait en effet, d'après ces données, à obtenir 120 descendants par adulte et par jour. Or, les mesures de fécondité que nous avons effectuées sur une centaine d'adultes donnent une moyenne de 14 descendants par individu parental, dans les conditions d'élevage axénique. C'est seulement dans les cultures xéniques sur gélose, que l'on obtient effectivement une centaine d'individus en 24 heures. Mais il est bien sûr imprudent d'appliquer, sans corrections, les résultats de marquage obtenus dans des conditions axéniques

à des individus élevés dans des conditions xéniques. Il est possible que si l'on pouvait fournir la thymidine tritiée à ces derniers individus, les modalités du marquage se trouveraient modifiées.

Dans ces conditions, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer la contradiction entre le débit évalué par le marquage et le débit exprimé par la fécondité :

a) ou bien l'évaluation du débit à partir du marquage est faussée par suite des conditions régionales de croissance de la gonade. Il se pourrait par exemple que les cellules du pachytène s'accumulent sous cette forme pour y rester bloquées, du moins la plupart d'entre elles. Seule une faible proportion s'engagerait dans le processus terminal de l'ovogenèse.

b) ou bien une proportion élevée des ovocytes donne lieu à des développements abortifs et à une lyse rapide des oeufs libérés dans le milieu.

Dans l'état actuel des observations, il nous est impossible d'apporter des arguments fermes en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses. De nombreuses expériences complémentaires pourraient sans doute éclaircir ces données.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'incorporation de la thymidine tritiée dans les cellules germinales de Caenorhabditis briggsae nous a permis d'étudier certains aspects du métabolisme de l'ADN en fonction de la physiologie de l'appareil génital. Nous avons montré que les cellules formées à l'apex sont le siège d'une synthèse d'ADN active, préparatoire aux divisions mitotiques et méiotiques. Nous avons établi une méthode permettant d'évaluer la vitesse avec laquelle les cellules migrent vers l'orifice génital.

L'incorporation de la TdR- H_3 dans les cellules germinales nous a permis également d'aborder des problèmes d'ordre plus général concernant les rapports entre la dégradation de la TdR- H_3 et l'apparition de marquage cytoplasmique non spécifique. Ainsi l'extrait de foie qui provoque une dégradation rapide de la thymidine tritiée fait apparaître un marquage cytoplasmique importun.

L'extrait de foie est une substance labile, une variation dans sa préparation ou sa conservation peut conduire à des différences importantes d'activité enzymatique. C'est peut-être de cette façon que l'on pourrait expliquer les différences entre les résultats de NONNENMACHER-GODET et DOUGHERTY (1964) et les nôtres. En effet, il est très curieux de constater que nous n'avons pas retrouvé une partie des observations de NONNENMACHER-GODET et DOUGHERTY ; ni le marquage des noyaux de l'intestin, ni la disparition des marquages après postincubation.

L'absence de marquage dans les noyaux de l'intestin pourrait signifier que, dans nos expériences, la croissance des animaux est plus lente que celle des animaux étudiés par les auteurs précédents. Le démarquage qu'ils

ont constaté dans les cellules des gonades au cours des postincubations pourrait également tenir au fait que le débit de cellules ovariennes ait été plus élevé dans leurs expériences que dans les nôtres, ce qui serait en accord avec l'hypothèse d'une croissance relativement plus lente dans nos expériences. Il est tentant d'attribuer ces divergences à des modifications dans la constitution de l'extrait de foie indispensable aux Nématodes et susceptible d'exercer une influence importante sur leur croissance. Mais on pourrait aussi bien envisager que, dans les expériences de NONNENMACHER-CODET et DOUGHERTY, l'extrait de foie employé n'a pas présenté au même degré que dans nos expériences l'aptitude à dégrader la thymidine ; ceci aurait permis l'incorporation du précurseur dans des conditions plus favorables.

D'autres hypothèses pourraient être émises, l'extrait de foie représentant un élément labile aux propriétés inconnues.

Si au terme de cette étude il devait être établi un programme d'expériences complémentaires, on voit qu'elles seraient nombreuses. Mais il semble avant tout indispensable de mettre au point un milieu d'élevage reproductible ; ceci permettrait d'éviter les aléas qui accompagnent la fabrication artisanale d'un extrait cellulaire aux propriétés mal connues. C'est sans doute le prix qu'il faudra payer pour que deviennent rentables bien des études sur la physiologie, lacytologie et la génétique des Nématodes libres.

BIBLIOGRAPHIE

- APELGOT (S.) ECKERT (B.) - 1963 - Autodecomposition of H₃-Thymidine in water-solution : action of temperature in presence of a protector (cysteanine).
Conference on methods of preparing and storing marked molecules, november 1963, Brussels (Belgium).
- BAUGNET-MAHIEU (L.) GOUTIER (R.) SEMAL (M.) - 1964 - Anomalie de comportement de la thymidine tritiée au cours de sa phosphorylation in vitro.
Arch. Int. Physiol. Biochem., 72, 312.
- BAYLY (R.J.) WEICEL (H.) - 1960 - Self decomposition of compounds labelled with radioactive isotopes.
Nature, 188, 384.
- BELL (P.R.) MUHLETHALER (S.) - 1964 - Evidence for the presence of DNA in the organelles of the egg cells of Pteridium aquilinum.
J. Mol. Biol., 8, 853.
- BERECH (J.) VAN WAGTENDONK (W.J.) - 1962 - Autoradiography of macromolecular change occuring in Paramecium aurelia during autogamy.
Exp. Cell Res., 26, 360.
- BRACHET (J.) - 1958 - New observations on biochemical interactions between nucleus and cytoplasm in Amoeba and Acetabularia.
Exp. Cell Res., 6, 78.
- BRIGGS (M.P.) - 1946 - Culture methods for a free-living soil nematode.
M.A. Thesis, Stanford Univ., Stanford, Calif.
- CHANG (R.S.) VETROVS (H.) - 1963 - Loss of radioactivity from labelled DNA of primary human amnion cells.
Science, 139, 1211.
- DELAVALT (R.) - 1957 - Développement, croissance et fonctionnement des glandes génitales chez les Nématodes libres.
Arch. Zool. Exp. Gén., 27, 109.

- DEVIK (D.) HALVORSEN (K.) - 1963 - Observation by biochemical analysis and autoradiography on labelled DNA in the normal and regenerating liver of mice.
Nature, 197, 148.
- DOUGHERTY (E.C.) - 1953 - Some observations on the monoxenic cultivation of certain Rhabditid Nematodes.
J. of Parasitol., 39, 4.
- DOUGHERTY (E.C.) HANSEN (E.L.) - 1956 - Axenic cultivation of Caenorhabditis briggsae. V - Maturation on synthetic media.
Proceed. Soc. Exper. Biol. Med., 93, 223.
- DOUGHERTY (E.C.) HANSEN (E.L.) NICHOLAS (W.L.) MOLLETT (J.A.) YARDWOOD (E.A.)
Axenic cultivation of Caenorhabditis briggsae (Nematoda : Rhabditis) with unsupplemented and supplemented chemically defined media.
Ann. N.Y. Acad. Sc., 77, 176.
- EVANS (E.A.) STANFORD (F.G.) - 1963 a - Decomposition of Tritium labelled organic compounds.
Nature, 197, 551.
- EVANS (E.A.) STANFORD (F.G.) - 1963 b - Stability of thymidine labelled with Tritium or Carbon₁₄.
Nature, 199, 762.
- FATT (H.V.) - 1960 - Genetic control of maturation and reproduction in the Nematode Caenorhabditis elegans.
Thesis, Berkeley Univ., Berkeley, Calif.
- FICQ (A.) - 1959 - "The Cell" - Autoradiography, Chap. 3, 67.
Academic Press, New-York and London.
- FINK (K.) CLINE (R.E.) HENDERSON (R.B.) FINK (R.M.) - 1956 - Metabolism of thymine methyl C₁₄ or 2-C₁₄ by rat liver in vitro.
J. Biol. Chem., 221, 425.
- FINK (R.M.) FINK (K.) - 1961 - Biosynthesis of radioactive RNA and DNA pyrimidines from thymidine 2-C₁₄.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 6, 7.
- FINK (R.M.) FINK (K.) - 1962 - Biological conversion of thymidine to unmethylated pyrimidines.
Fed. Proceed., 21, 377.
- GIRGIS (A.) VIEUCHANGE (J.) - 1964 - Incorporation de thymidine radioactive dans des cellules de Mammifères cultivées in vitro.
Ann. Inst. Pasteur, 106, 29.
- NONNENMACHER-GODET (J.) DOUGHERTY (E.C.) - 1964 - Incorporation of tritiated thymidine in the cells of Caenorhabditis briggsae (Nematoda)

reared in axenic culture.
J. Cell Biol., 22, 281.

LOEFFLER (C.A.) JOHNSTON (M.C.) - 1964 - Permeability alterations in amphibian embryos caused by salts solution and measured by TdR-H₃ uptake.
J. Embryol. Exp. Morph., 12, 407.

NICHOLAS (W.L.) DOUGHERTY (E.C.) HANSEN (E.L.) - 1959 - Axenic cultivation of Caenorhabditis briggsae (Nematoda : Rhabditidae) with chemically undefined supplements ; comparative studies with related Nematodes.
Ann. N.Y. Acad. Sc., 77, 218.

NIGON (V.) - 1949 - Les Modalités de la reproduction et le déterminisme du sexe chez quelques Nématodes libres.
Ann. Sc. Nat. Zool. Ser., 11, 11, 1.

NIGON (V.) BRUN (J.) - 1955 - L'évolution des structures nucléaires dans l'ovogenèse de Caenorhabditis elegans Maupas 1900.
Chromosoma, 7, 129.

OLSZEWSKA (M.J.) MIKULSKA (E.) - 1964 - Etude autoradiographique de l'incorporation de TdR-H₃ dans les chloroplastes de Clivia miniata et Bilbergia sp.
Experientia, XX, 267.

PELC (S.R.) - 1956 - The stripping-film technique of autoradiography.
Internat. J. Appl. Radiobiol. and Isotopes, 1, 172.

PELC (S.R.) - 1959 - Metabolic activity of DNA as shown by autoradiography.
Lab. Invest., 8, 225.

PELC (S.R.) - 1962 - Incorporation of TdR-H₃ in various organs of the mouse.
Nature, 193, 793.

PELC (S.R.) - 1963 - On the question of renewal of differentiated cells.
Exp. Cell Res., 29, 193.

PELC (S.R.) - 1964 - Labelling of DNA and cell division in so called non-dividing tissues.
J. Cell Biol., 22, 21.

PLAUT (W.) SAGAN (L.A.) - 1958 - Incorporation of thymidine in the cytoplasm of Amoeba proteus.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 843.

POTTER (V.R.) - 1959 - Metabolic products formed from Thymidine.
 In "The Kinetics of cellular proliferation", Stohlman, ed., p. 104.

ROBINOVITZ (M.) PLAUT (W.) - 1962 - Cytoplasmic DNA synthesis in Amoeba

proteus. II - On the behaviour and possible nature of the DNA-containing elements.
J. Cell Biol., 15, 535.

ROYCHOUDHURY (R.) SEN (S.P.) - 1963 - Metabolic conversion of Thymine₂C₁₄ and its incorporation into nuclear RNA of endosperm nuclei of Cocos nucifera.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 14, 7.

SCHER (S.) SAGAN (L.A.) - Comparative studies of chloroplast replication : ultra-violet inactivation and photo reactivation of cytoplasmic DNA synthesis associated with chloroplast replication in Euglena gracilis.
J. Protozool., 9, 13.

SCHERBAUM (O.H.) - 1960 - Possible sites of metabolic control during the induction of synchronous cell division.
Ann. N.Y. Acad. Sc., 90, 565.

TAKATS (S.T.) SMELLIE (R.M.S.) - 1963 - Thymidine degradation products in plant tissues labelled with tritiated thymidine.
J. Cell. Biol., 17, 59.

WOODARD (J.) RASCH (E.) SWIFT (H.) - 1961 - Nucleic acid and protein metabolism during the mitotic cycle in Vicia faba.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 445.

Vu :

Les Membres du Jury,

MM. NIGON

LEGAY

LAVIOLETTE

Vu et approuvé,

Le Doyen de la Faculté des Sciences

J. BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer

LYON, le 27 septembre 1965

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS

